

· 基础研究 ·

穹窿海马伞切断和卵巢切除对大鼠不同脑区雌激素受体 α 与淀粉样 β 蛋白前体蛋白 β 位点裂解酶共存表达的影响 *金丽英¹ 郭宗君^{1,3} 崔红波²

摘要 目的:探讨穹窿-海马伞切断和卵巢切除大鼠大脑雌激素受体 α (ER α)与 β 淀粉样蛋白前体蛋白 β 位点裂解酶(BACE)共存表达的变化。方法:成年健康雌性 Wistar 大鼠 28 只,随机分为穹窿-海马伞切断组(FF 组)、卵巢切除组(OVX 组)、穹窿-海马伞切断加卵巢切除组(OF 组)和对照组。每组 7 只。免疫荧光双标细胞化学法染色,激光共聚焦显微镜下观察大鼠大脑皮质区、海马 CA1 区 ER α 、BACE 阳性细胞表达的变化。结果:FF 组、OVX 组和 OF 组大鼠皮质区和海马 CA1 区 ER α 阳性细胞与对照组比较显著减少(皮质区:4.71 $\pm$ 1.11, 5.29 $\pm$ 2.01, 4.42 $\pm$ 3.99 vs 9.71 $\pm$ 4.53;海马区:6.91 $\pm$ 2.63, 7.58 $\pm$ 4.16, 5.14 $\pm$ 3.80 vs 12.57 $\pm$ 3.59, 均 $P<0.05$);FF 组、OVX 组和 OF 组大鼠皮质区和海马 CA1 区 BACE 阳性细胞与对照组比较显著增多(皮质区:15.78 $\pm$ 6.01, 17.63 $\pm$ 4.42, 20.00 $\pm$ 5.16 vs 5.71 $\pm$ 3.14;海马区:15.91 $\pm$ 5.12, 12.34 $\pm$ 5.07, 17.14 $\pm$ 4.45 vs 6.85 $\pm$ 1.95, 均 $P<0.05$)。但三组之间两两比较无显著性差异($P>0.05$)。OF 组大鼠皮质区 ER α 和 BACE 双标阳性细胞数与对照组比较显著增多($P<0.05$),但海马 CA1 区无显著性变化($P>0.05$)。结论:穹窿-海马伞切断或卵巢切除可以导致大鼠大脑皮质区、海马 CA1 区 ER α 表达减少、BACE 表达增多,两种方法同时作用导致皮质区共存细胞表达增多。

关键词 穹窿下器官;海马;卵巢切除术;受体;雌激素;淀粉样 β 蛋白前体

中图分类号:R749.1, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-09-0782-03

Coexist expression and relation of estrogen receptor α and β -site β -amyloid precursor protein cleaving enzyme in rat's brain with fimbria/fornix transection and ovariectomy/JIN Liying, GUO Zongjun, CUI Hongbo//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(9): 782—784

Abstract Objective: To observe the coexist expressive variety of estrogen receptor α (ER α) and β -site β -amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) in the cerebral cortex and hippocampus CA1 of rat's brain with fimbria/fornix transection and ovariectomy. **Method:** Twenty-eight healthy female rats were randomly divided into four groups, fimbria/fornix transection group(FF), ovariectomized group(OVX), fimbria/fornix transection and ovariectomized group(OF), control group. There were seven rats in every group. The bilateral fimbria-fornix of brain were transected in the stereotaxic apparatus according to Klein's method and bilateral ovaries were ablated according to Singh's method in order to establish rat's model. **Result:** In cerebral cortex and hippocampus CA1 of brain of FF group, OVX group and OF group, amounts of green cells of ER α decreased remarkably than that in control group(cortex: 4.71 $\pm$ 1.11, 5.29 $\pm$ 2.01, 4.42 $\pm$ 3.99 vs 9.71 $\pm$ 4.53;hippocampus: 6.91 $\pm$ 2.63, 7.58 $\pm$ 4.16, 5.14 $\pm$ 3.80 vs 12.57 $\pm$ 3.59, all $P<0.05$) and the amounts of red cells of BACE improved remarkably than that in control group (cortex: 15.78 $\pm$ 6.01, 17.63 $\pm$ 4.42, 20.00 $\pm$ 5.16 vs 5.71 $\pm$ 3.14;hippocampus: 15.91 $\pm$ 5.12, 12.34 $\pm$ 5.07, 17.14 $\pm$ 4.45 vs 6.85 $\pm$ 1.95, all $P<0.05$). **Conclusion:** Fimbria/fornix transection or ovariectomy can cause the expression of ER α positive neurons decreasing and BACE positive neurons increasing in cerebral cortex and hippocampus CA1 of rat's brain, the combination fimbria/fornix transection and ovariectomy can cause double labeling cells improving in cerebral cortex.

Author's address Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003

Key words subfornical organ; hippocampus; ovariectomy; receptor, estrogen; amyloid beta-protein precursor

目前,许多研究关注认知障碍的病理机制与康复^[1]。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)属于认知障碍的重要疾病之一,从认知障碍动物模型的角度观察其发生机制,对本病的临床康复治疗具有重要意义。研究表明, β 淀粉样肽(amyloid beta-protein, A β)是由淀粉样 β 蛋白前体蛋白(amyloid beta-protein precursor, APP)经 APP β 位点裂解酶(β -

* 基金项目:山东省科技厅科研基金(003130110,22130109)

1 青岛大学医学院附属医院脑血管病研究所,青岛市江苏路 16 号, 266003

2 兖矿集团公司总医院神经内科

3 通讯作者:郭宗君(青岛大学医学院附属医院脑血管病研究所,青岛市江苏路 16 号,266003)

作者简介:金丽英,女,副研究员

收稿日期:2006-09-26

site β -amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE) 和 γ 分泌酶等裂解产生的^[2], 其中 A β 1-40,42 是导致 AD 病变的主要因素。雌激素和乙酰胆碱与 APP 的代谢过程密切相关^[3-4], 在 AD 发病过程中具有重要作用。本实验以双侧穹隆-海马伞切断和双侧卵巢切除的方法, 造成大鼠脑内胆碱能神经远端支配区的乙酰胆碱功能下降和体内雌激素缺乏, 试图模拟老年女性 AD 体内递质的变化过程^[3-4], 应用免疫荧光双标细胞化学染色法, 激光共聚焦显微镜下观察海马 CA1 区和皮质区雌激素受体 α (estrogen receptor, ER α)、BACE 阳性细胞的表达以及共存表达的变化, 以探讨雌激素、胆碱能神经及 BACE 之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选择健康雌性 Wistar 大鼠 28 只, 5 月龄, 体重 220—250g, 清洁级, 由山东省医学科学院动物实验中心提供(动物合格证号为 GB14922-94), 环境温度 22℃, 各组大鼠自由摄食和饮水(青岛大学医学院实验动物中心生产的标准固体饲料), 随机分为 4 组: 双侧穹隆-海马伞切断组(FF 组)、双侧卵巢切除组(OVX 组)、双侧穹隆-海马伞切断加双侧卵巢切除组(OF 组)、对照组, 每组 7 只。各组大鼠照明、通风、温度、湿度等饲养环境条件相同。

1.2 动物模型制作

参考 Singh^[3]和 Krugel^[4]的方法制作大鼠模型。

1.2.1 卵巢切除: 100g/L 水合氯醛(300mg/kg)麻醉大鼠, 在腰背部中央切开皮肤找到肾脏下方的卵巢, 结扎并切除双侧卵巢。

1.2.2 穹隆-海马伞切断: 大鼠经 100g/L 水合氯醛(300mg/kg)麻醉, 固定于江湾 IC 型脑立体定位仪, 于前囟后 2.2—2.5mm, 中线外 1mm 处, 自制双刃刀降刀 4.5mm, 外移 1mm, 然后再降刀 1mm, 外移 1.5mm, 上下抽动刀约 20 次, 完全切断海马伞外侧缘。

1.2.3 卵巢切除加穹隆海马伞切断: 按上述方法将大鼠双侧卵巢切除和双侧穹隆海马伞切断。

1.2.4 对照组大鼠除了不切除卵巢和不切断穹隆-海马伞外, 其余处理同上。

各组大鼠术后常规饲养, 观察 28d 后处死。

1.3 脑组织病理观察

1.3.1 心脏灌注和脑组织取材: 按文献的方法多聚甲醛灌注固定大鼠, 取脑备用^[3-4]。脑组织石蜡包埋后, 连续冠状切片, 片厚 5 μ m, 用于免疫荧光双标细胞化学染色。

1.3.2 免疫荧光双标细胞化学染色: 切片经 PBS 溶液漂洗, 10% 正常血清 37℃ 孵育 1h; 浸入兔抗鼠多克隆 ER α 抗体 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) 和小鼠抗大鼠单克隆 BACE 抗体 (1:100, 中山公司) 37℃ 孵育 1h, PBS 漂洗后入 FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:100, ZF0311, 中山公司) 和罗达明标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:100, ZF0313, 中山公司) 37℃ 孵育 1h, PBS 溶液漂洗, 甘油封片。用 PBS 替代一抗作为阴性对照, 其余步骤相同。

参考 Paxinos 等^[5]编写的大鼠脑图谱, ZESS 激光共聚焦显微镜下随机各取 5 个视野观察大脑皮质和海马 CA1 区 ER α 、BACE 单标和双标阳性细胞的数量, 计算平均单个视野中表达的阳性细胞数。

1.4 统计学分析

所有资料均采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析, 组间两两比较采用 q 检验。数据采用均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

ER α 免疫反应阳性细胞主要在细胞核表达, 呈现绿色荧光, BACE 免疫阳性细胞主要在胞膜与胞浆内表达, 呈现红色荧光。两种荧光均存在的细胞为 ER α 与 BACE 双标阳性细胞 (图 1、5, 见前置彩色插页 8)。实验结果发现: FF 组、OVX 组和 OF 组大鼠皮质区、海马 CA1 区绿色 ER α 单标阳性细胞数显著减少, 红色 BACE 单标阳性细胞数显著增多, 与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$) (图 2—4, 图 6—8, 见前置彩色插页 8)。但三组之间两两比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。OF 组皮质区 ER α 与 BACE 双标细胞数显著增多, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$) (图 8, 见前置彩色插页 8), 但在海马 CA1 区差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 4, 见前置彩色插页 8)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同脑区 ER α 、BACE 单标和双标阳性细胞数比较

($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

组别	鼠数	皮质区			海马 CA1 区		
		ER α	BACE	ER α /BACE	ER α	BACE	ER α /BACE
对照组	7	9.71 $\pm$ 4.53	5.71 $\pm$ 3.14	1.14 $\pm$ 1.67	12.57 $\pm$ 3.59	6.85 $\pm$ 1.95	2.00 $\pm$ 2.08
FF 组	7	4.71 $\pm$ 1.11 ^①	15.78 $\pm$ 6.01 ^①	1.85 $\pm$ 1.59	6.91 $\pm$ 2.63 ^①	15.91 $\pm$ 5.12 ^①	2.88 $\pm$ 1.86
OVX 组	7	5.29 $\pm$ 2.01 ^①	17.63 $\pm$ 4.42 ^①	1.76 $\pm$ 1.03	7.58 $\pm$ 4.16 ^①	12.34 $\pm$ 5.07 ^①	3.19 $\pm$ 2.65
OF 组	7	4.42 $\pm$ 3.99 ^①	20.00 $\pm$ 5.16 ^①	4.00 $\pm$ 2.94 ^①	5.14 $\pm$ 3.80 ^①	17.14 $\pm$ 4.45 ^①	2.01 $\pm$ 2.08

① 表示与对照组比较: $q = 2.97—4.15$, $P < 0.05$

3 讨论

雌激素受体属核受体, 有两个亚型: 受体 α 、 β , 分别由两个不同的基因翻译而得, $ER\alpha$ 对雌激素的亲合力高于 $ER\beta$, 并可在不同的脑区被雌二醇差异性地上调或下调, 雌激素与其受体结合形成激素-受体复合物, 通过多种信号途径对人类及动物的学习、记忆等认知过程产生作用^[6]。基底神经核和内侧隔核是脑内胆碱能神经元的主要分布区, 他们发出纤维投射到海马和大脑皮质, 所释放的乙酰胆碱占大脑皮质释放乙酰胆碱的绝大部分, 与记忆的形成和储存有关^[4]。Beach 等^[7]研究发现皮层胆碱能神经元活性降低, 可以直接促进非淀粉样片段的 APP 加工途径, 导致 $A\beta$ 表达明显增加, 对神经细胞具有确切的损伤作用。本实验采用大鼠双侧穹隆海马伞切断和双侧卵巢切除建立动物模型, 其机制在于损伤隔区胆碱能神经纤维至海马与皮层的投射, 造成大鼠脑内胆碱能损伤和雌激素缺乏, 结果显示 FF 组、OVX 组和 OF 组大鼠皮质区和海马 CA1 区 $ER\alpha$ 免疫荧光阳性细胞数较对照组明显减少。其机制可能是大鼠切除卵巢后, 体内雌激素缺乏, 导致雌激素受体的退用性萎缩或减少, 同时在穹隆海马伞切断的情况下, 胆碱能神经系统损伤并发生蜕变, 影响了雌激素受体存在的物质基础, 损伤了 ER、胆碱乙酰化转移酶、酪氨酸激酶 A 的共存^[8]。

BACE 为 501 个氨基酸组成的跨膜天冬氨酸蛋白酶, 是 APP 代谢过程中产生毒性 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 的第 1 个关键酶。 $A\beta$ 积累到一定浓度时发生聚集, 并迅速导致淀粉样沉积, 对神经细胞产生直接的毒性作用^[9]。脑中雌激素含量与 APP 代谢和 $A\beta$ 产生有关, 雌激素可增强 α 分泌酶的活性, 从而导致可溶性淀粉样蛋白的生成^[10]。本实验中观察到 FF 组、OVX 组和 OF 组大鼠皮质区和海马 CA1 区 BACE 免疫荧光阳性细胞数明显增多, 可能是由于雌激素缺乏导致 α 分泌酶的活性减弱, 而 α 分泌酶与 BACE 具有相互竞争性效应^[11], 因而推测导致 BACE 代偿性增高, 或存在其他机制引起 BACE 表达增高。OF 组大鼠皮质区 $ER\alpha$ 和 BACE 共存细胞显著增多, 可能是 BACE 增多导致的共存表达增多所致。但为何在海马区表达没有显著性差异? 可能与海马区 $ER\alpha$ 生理表达量少有关, 其进一步机制有

待深入研究。

本实验在双侧穹隆海马伞切断和双侧卵巢切除状态下, 皮质区和海马 CA1 区 $ER\alpha$ 、BACE 表达阳性细胞数显示同步性反向趋势, 而且显示 $ER\alpha$ 、BACE 在同一细胞具有共存表达的现象, 说明雌激素系统、胆碱能神经系统与 APP 代谢系统存在相互作用, 与 AD 发病过程有关, 与既往报道具有一致性^[9]。但其详细机制需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 谢欲晓. 认知康复的新领域—认知神经心理康复[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(1): 5.
- [2] Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease $A\beta$ amyloid peptides [J]. Peptides, 2002, 23(7): 1285.
- [3] Singh M, Meyer EM, Millard WJ, et al. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female SD rats [J]. Brain Res, 1994, 644(2): 305.
- [4] Krugel U, Bigl V, Eschrich K, et al. Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease [J]. Int J Devl Neurosci, 2001, 19(3): 263.
- [5] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. Sydney: Academic Press Australia, 1988, 23.
- [6] Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson J, et al. Differential distribution and regulation of estrogen receptor alpha and receptor β mRNA with in the female rat brain [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 54(1): 175.
- [7] Beach TG, Potter PE, Kuo YM, et al. Cholinergic deafferentation of the rabbit cortex: A new animal model of $A\beta$ deposition[J]. Neurosci Lett, 2000, 283(1): 9.
- [8] Gibbs RB. Levels of $trkA$ and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement[J]. Brain Res, 1998, 787(2): 259.
- [9] 郭宗君, 金丽英, 杜芳, 等. 雌激素对去卵巢大鼠不同脑区淀粉样 β 蛋白前体蛋白 β 位点裂解酶表达的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(36): 185.
- [10] Funato H, Yoshimura M, Kusui K, et al. Quantitation of amyloid β -protein ($A\beta$) in the cortex during aging and in Alzheimer disease[J]. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1633.
- [11] Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, et al. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies[J]. Brain Res Rev, 2001, 37(1-3): 313.